

D186

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平1-252294

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成1年(1989)10月6日

C. 12 P 7/64  
C 07 C 69/587

6926-4B  
8018-4H

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 不飽和脂肪酸エステルの濃縮方法

⑯ 特 願 昭63-80715

⑰ 出 願 昭63(1988)3月31日

⑱ 発 明 者 森 岡 憲 祐 兵庫県尼崎市武庫之荘西2丁目53番地1-504  
⑲ 発 明 者 前 田 皓 一 兵庫県神戸市西区玉津町今津195-14  
⑳ 発 明 者 石 田 聡 朗 兵庫県宝塚市光が丘1丁目17番24号  
㉑ 出 願 人 日本油脂株式会社 東京都千代田区有楽町1丁目10番1号  
㉒ 代 理 人 弁理士 祿宜元 邦夫

# 明 細 書

## 1. 発明の名称

不飽和脂肪酸エステルの濃縮方法

## 2. 特許請求の範囲

(1) 炭素-炭素二重結合に隣接する炭素原子のうちカルボキシル基側に最も近い炭素原子がカルボキシル基の炭素原子から数えて4番目、5番目、6番目のいずれかの炭素原子となる炭素数18以上の不飽和脂肪酸を含む脂肪酸混合物の低級1価アルコールエステルよりなる脂肪酸エステルと多価アルコールとを抽脂加水分解酵素によりエステル交換させたのち、未反応の脂肪酸エステルを回収することを特徴とする不飽和脂肪酸エステルの濃縮方法。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は不飽和脂肪酸エステルの濃縮方法に関するものである。

(従来の技術)

不飽和脂肪酸の中でもγ-リノレン酸、アラキ

ドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸などは、プロスタグランジンやトロンボキサンなどとの関連においてその生理活性作用が研究されており、各種成人病治療薬や予防薬として注目されている。

ところで、これらの不飽和脂肪酸は、天然脂質中にグリセリドの状態で含まれているが、天然脂質を構成する脂肪酸は、上記の不飽和脂肪酸のほか、オレイン酸やリノール酸などの他の不飽和脂肪酸やパルミチン酸、ステアリン酸などの飽和脂肪酸を含む混合物からなるため、この混合物より上述の如き特定の不飽和脂肪酸を選択的に分離濃縮する必要がある。

不飽和脂肪酸を濃縮する方法には、今日まで数多く知られているが、このうち特に有効な方法として天然脂質を一旦低級1価アルコールのエステルとし、このエステルを出発原料として不飽和脂肪酸の濃縮を図る方法がある。

このような低級1価アルコールエステルの濃縮方法としては、(イ)クロマトグラフによる方法、

(ロ) 揮発剤による方法、(ハ) 尿素付加物による方法、(ニ) 油脂加水分解酵素(以下、リパーゼという)を使用する方法(特開昭59-14793号公報)などが知られている。

(発明が解決しようとする課題)

しかしながら、上記公知の濃縮方法は、前記したγ-リノレン酸、アラキドン酸などの特定の不飽和脂肪酸を選択的に濃縮しようものとはいえず、そのうえ以下の如き欠点があつた。

すなわち、前記の(イ)および(ロ)の方法は、大量の有機溶剤を使用する必要がある、有機溶剤の回収を行わなければならない点で充分なものではなかつた。また、(ハ)の方法は、高濃度の不飽和脂肪酸エステルが得られるものの、多量の尿素やメタノールなどの有機溶剤を必要とし、反応液中からの不飽和脂肪酸エステルの回収が容易でなかつた。

さらに、(ニ)の方法は、高度不飽和脂肪酸エステルがリパーゼにより加水分解作用を受け難いというリパーゼの特異的反応性を利用した濃縮方

法であるが、生成した遊離脂肪酸と高度不飽和脂肪酸エステルとの分離に際し、遊離脂肪酸を中和したうえで高度不飽和脂肪酸エステルを大量のヘキサンなどの有機溶剤で抽出しなければならない点でやはり充分なものではなかつた。

本発明は、上記の事情に鑑み、前記したγ-リノレン酸、アラキドン酸などの不飽和脂肪酸を含む脂肪酸混合物の低級1価アルコールエステルよりなる脂肪酸エステルを用いて、上記特定の不飽和脂肪酸(のエステル)を上述の如き問題をきたすことなく、つまり大量の有機溶剤を用いることなく、効率良く濃縮する方法を提供することを目的としている。

(課題を解決するための手段)

本発明者らは、上記の目的を達成するために、まず不飽和脂肪酸の種類によるリパーゼの作用度の相違につき検討した結果、炭素-炭素二重結合に隣与する炭素原子のうちカルボキシル基側に最も近い炭素原子がカルボキシル基の炭素原子か

ら数えて何番目の炭素原子となるかにより(以下、 $n$ 番目の炭素原子となる不飽和脂肪酸を $\Delta n$ の位置に二重結合を有する不飽和脂肪酸という)、リパーゼの作用度合いが相違し、特に $\Delta 9$ の位置に二重結合を有するオレイン酸、リノール酸、 $\alpha$ -リノレン酸などの不飽和脂肪酸のグリセリドに対しては、ステアリン酸などの飽和脂肪酸のグリセリドに対するのと同様に、よく作用するが、 $\Delta 4$ 、 $\Delta 5$ または $\Delta 6$ の位置に二重結合を有する前記γ-リノレン酸、アラキドン酸などの不飽和脂肪酸のグリセリドに対しては、わずかしき作用しないことを見出した。

この知見をもとにさらに検討を加えた結果、不飽和脂肪酸の種類による上記リパーゼの特異的反応性は、油脂の加水分解だけでなく、リパーゼを用いたエステル交換反応の場合にも同様に認められ、この特異的反応性を利用すれば、本発明の目的とするγ-リノレン酸、アラキドン酸などの特定の不飽和脂肪酸(のエステル)の濃縮を容易に達成しようものであることを知り、遂に本発明を

完成するに至つた。

すなわち、本発明は、 $\Delta 4$ 、 $\Delta 5$ 、 $\Delta 6$ のいずれかの位置に二重結合を有する炭素数18以上の不飽和脂肪酸を含む脂肪酸混合物の低級1価アルコールエステルよりなる脂肪酸エステルと多価アルコールとをリパーゼによりエステル交換させたのち、未反応の脂肪酸エステルを回収することを特徴とする不飽和脂肪酸エステルの濃縮方法に係るものである。

このように、本発明においては、 $\Delta 4$ 、 $\Delta 5$ 、 $\Delta 6$ のいずれかの位置に二重結合を有する前記γ-リノレン酸、アラキドン酸などの炭素数18以上の不飽和脂肪酸の低級1価アルコールエステルが、上記以外の不飽和脂肪酸たとえば $\Delta 9$ の位置に二重結合を有する前記オレイン酸、リノール酸などの不飽和脂肪酸やペルミチン酸、ステアリン酸などの飽和脂肪酸の低級1価アルコールエステルに較べて、リパーゼによるエステル交換反応つまり加水分解およびエステル化反応を受けにくいという性質を利用して、まずこれら低級1価アル

コールエステルの混合物としての脂肪酸エステルと多価アルコールとをリパーゼによりエステル交換させることにより、後者の不飽和脂肪酸や飽和脂肪酸の低級1価アルコールエステルを主として多価アルコールエステルに変換させ、前者の不飽和脂肪酸の低級1価アルコールエステルはこれを主として未反応物として残存させる。

つぎに、このエステル交換反応後、生成した多価アルコールエステルと未反応の低級1価アルコールエステルとを分離する。この分離は、分子蒸留、水蒸気蒸留、イオン交換樹脂、溶剤抽出などによつて、前記従来の如き多量の有機溶剤を必要とすることなく容易に行うことができ、このように分離回収された低級1価アルコールエステルよりなる脂肪酸エステルは、上記の説明にてもはや明らかなように、前記したΔ4、Δ5、Δ6のいずれかの位置に二重結合を有する不飽和脂肪酸エステルがエステル交換前の脂肪酸エステルに比しより高濃度で含まれている。すなわち、リパーゼを用いたエステル交換反応後の上記分離操作によ

り、本発明の目的とする不飽和脂肪酸エステルの濃縮が簡単に実現されるのである。

#### (発明の構成・作用)

本発明においては、まずΔ4、Δ5、Δ6のいずれかの位置に二重結合を有する炭素数18以上の不飽和脂肪酸を含む脂肪酸混合物の低級1価アルコールエステルよりなる脂肪酸エステルを調製する。これの調製は、たとえば上記の脂肪酸混合物のグリセリドからなる脂質と低級1価アルコールとを常法により反応させればよい。

Δ4、Δ5、Δ6のいずれかの位置に二重結合を有する炭素数18以上の不飽和脂肪酸としては、ドコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸（いずれもΔ4の位置に二重結合を有する不飽和脂肪酸）、エイコサトリエン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸（いずれもΔ5の位置に二重結合を有する不飽和脂肪酸）、ペトロセリン酸、γ-リノール酸、γ-リノレン酸、オクタデカテトラエン酸（いずれもΔ6の位置に二重結合を有する不飽和脂肪酸）などがある。

7

これら不飽和脂肪酸を含有する脂肪酸混合物のグリセリドからなる脂質としては、魚油、鯨油などの海産動物油や、月見草、ユキノシタ、ルリジシャ、バセリ、コリアンダー、黒スグリ、赤スグリなどの種子油や、クロレラ属、スピルリナ属、ボルフィリディウム属などの藻類から得られる脂質や、ミドリ虫などの原生動物から得られる脂質や、カニンガメラ属、フィコミセス属、ロドスボリディウム属、エントモフトラ属、コニディオボラス属などの微生物より得られる脂質などが挙げられる。

また、上記の脂質と反応させる低級1価アルコールとしては、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールなどが挙げられる。

本発明においては、このような脂肪酸混合物の低級1価アルコールエステルよりなる脂肪酸エステルと多価アルコールとをリパーゼによりエステル交換させる。この方法は、上記の脂肪酸エステルとリパーゼ水溶液と多価アルコールとを混合し乳化状態でエステル交換させる方法、上記の脂肪

8

酸エステルとリパーゼを含む多価アルコール水溶液とを多孔性の膜を介して接触させてエステル交換させる方法など、リパーゼによりエステル交換しうる方法であればよい。

このようなエステル交換反応に用いるリパーゼは、Δ4、Δ5、Δ6のいずれかの位置に二重結合を有する不飽和脂肪酸に対して作用の少ないものとして、微生物、動物起源のものを使用することができる。

微生物由来のリパーゼとしては、リゾプス・キネンシス(*Rhizopus chinensis*)由来のリパーゼ、リゾプス・デレマー(*Rhizopus delenar*)由来のリパーゼ、キャンディダ・シリンドラツセ(*Candida cylindracea*)由来のリパーゼ、ジオトリクム・キャンディダム(*Geotrichum candidum*)由来のリパーゼ、ペニシリウム・サイクロピウム(*Penicillium cyclopium*)由来のリパーゼ、ムコール・ミイヘイ(*Mucor miehei*)由来のリパーゼ、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)由来のリパーゼなどがある。また、動物由来のリパーゼと

9

10

しては、ヒト、ブタ、ウシなどの群脂リパーゼが挙げられる。

これらリパーゼの使用量は、リパーゼの種類やエステル交換の方法により異なるが、通常は1gの脂質に対し10～1,000国際単位(IU)、好ましくは50～500IUである。この使用量が過少では反応が十分に進行せず、過多となつても反応の進行に大きな影響を与えず経済的に不利である。

なお、国際単位(IU)は、リパーゼ活性を有する酵素が最速反応条件(温度、pH)においてオリーブ油を加水分解し、1分間に1マイクロモル当量の脂肪酸を遊離する活性を1IUとするものである。

また、エステル交換用の多価アルコールとしては、エチレングリコール、プロピレングリコール、ブタンジオールなどの2価のアルコール、グリセリンなどの3価のアルコール、ペンタエリスリールなどの4価のアルコールなどがある。

これら多価アルコールの使用量としては、エス

テル交換の方法や目的とする不飽和脂肪酸の含有量などにより異なるため、これらに応じて適宜決めればよい。たとえば前記の脂肪酸エステルとリパーゼ水溶液と多価アルコールとを混合し乳化状態でエステル交換させる方法では、脂質に対して重量基準で0.5～100倍量、好ましくは1～50倍量とするのがよい。多価アルコールが過少ではエステル交換反応の進行が遅くなり、過多となつても反応の進行状態には大きな変化はなく経済的に不利である。

エステル交換に際しての反応温度および反応時間は、使用するリパーゼの種類および使用量により適宜決定されるが、反応時間としては、通常2～48時間とするのがよい。反応時間が短すぎるとエステル交換反応が十分に進行せず、長くなりすぎてもエステル交換は定常状態に近づき反応速度が遅くなるため、いずれも好ましくない。

本発明においては、このようなエステル交換を行つたのち、生成した多価アルコールエステルと未反応の低級1価アルコールエステルよりなる脂

11

肪酸エステルとの混合物から、上記未反応の脂肪酸エステルを分離する。この分離は、既述のとおり、分子蒸留による方法、水蒸気蒸留による方法、イオン交換樹脂を用いる方法、溶剤抽出による方法、またはこれらを組み合わせた方法などにより、容易に行える。

このようにして分離回収された未反応の脂肪酸エステルには、Δ4、Δ5、Δ6のいずれかの位置に二重結合を有する不飽和脂肪酸エステルがエステル交換前のものに較べてかなり高濃度で含まれている。つまり、上述の操作により本発明の目的とする不飽和脂肪酸エステルの濃縮が達成されるのである。

#### (発明の効果)

以上のように、本発明の方法によれば、Δ4、Δ5、Δ6のいずれかの位置に二重結合を有する不飽和脂肪酸エステルを、従来のような多量の有機溶剤を用いることなく、簡単な操作で効率良く濃縮できるから、医薬品原料や健康食品原料などの用途に適した不飽和脂肪酸エステルを従来に比

12

し有利に提供することができる。

#### (実施例)

以下、本発明の実施例を記載してより具体的に説明する。

#### 実施例1

脂肪酸混合物の低級1価アルコールエステルとして、いわし油(山姥産業製)を、酸媒としてソディウムメチラートを使用する常法によりメチルエステル化したのち、蒸留した脂肪酸メチルエステルを使用した。

この脂肪酸メチルエステルの脂肪酸組成を第1表に示した。なお、第1表中、脂肪酸の種類を示す各符号は、つぎのとおりであり、符号中の前者の数字は炭素数を、後者の数字は二重結合の数を、それぞれ表している。

16:0--パルミチン酸(飽和脂肪酸)

16:1--パルミトレイン酸(Δ9の位置に二重結合を有する不飽和脂肪酸)

18:1--オレイン酸(Δ9の位置に二重結合を有する不飽和脂肪酸)

18:3--γ-リノレン酸(Δ6の位置に二重結合を有する不飽和脂肪酸)

13

14

20:5-エイコサペンタエン酸 ( $\Delta 5$  の位置に二重結合を有する不飽和脂肪酸)

22:5-ドコサペンタエン酸 ( $\Delta 4$  の位置に二重結合を有する不飽和脂肪酸)

22:6-ドコサヘキサエン酸 ( $\Delta 4$  の位置に二重結合を有する不飽和脂肪酸)

まず、50ml のスクリー管に 2g の上記いわし油由来の脂肪酸メチルエステルと 2ml のテフロン製攪拌子を入れ、これを酵素反応装置 (松本製作所製、MS-50 型) に入れて回転攪拌しながら 37℃ で約 30 分間保温した。つぎに、キャンディダ・シリンドラツセ (*Candida cylindracea*) 由来のリパーゼ (名糖産業株製、商品名リパーゼ OF) が、200IU/g となるように調整した 90 重量%グリセリン水溶液を 10g 加えて 2 時間エステル交換反応を行った。

反応終了後、リパーゼを失活させるため沸騰水中で約 20 分間加熱したのち、n-ヘキサンで反応混合物を抽出することにより 1.9g の反応混合物を回収した。ついで、直径 1cm のカラムに 25g のシリカゲルを充填したカラムを用い、展開溶

剤としてクロロホルムを使用して、上記の反応混合物約 250mg を分離し、未反応の脂肪酸メチルエステル 155mg を回収した。

このようにして得た未反応の脂肪酸メチルエステルの脂肪酸組成を第 1 表に示した。この表より、 $\Delta 5$  の位置に二重結合を有するエイコサペンタエン酸、 $\Delta 4$  の位置に二重結合を有するドコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸の各エステルが、有効に濃縮されていることが判る。

#### 実施例 2

脂肪酸混合物の低級 1 価アルコールエステルとして、実施例 1 で使用した、いわし油由来の脂肪酸メチルエステルを使用した。

まず、50ml のスクリー管に 2g の上記いわし油由来の脂肪酸メチルエステルと 2ml のテフロン製攪拌子を入れ、これを酵素反応装置 (松本製作所製、MS-50 型) に入れて回転攪拌しながら 37℃ で約 30 分間保温した。つぎに、キャンディダ・シリンドラツセ (*Candida cylindracea*) 由来のリパーゼ (名糖産業株製、商品名リパー

15

ゼ OF) が、200IU/g となるように調整した 90 重量%グリセリン水溶液を 10g 加えて 5 時間エステル交換反応を行った。

反応終了後、リパーゼを失活させるため沸騰水中で約 20 分間加熱したのち、n-ヘキサンで反応混合物を抽出することにより 1.9g の反応混合物を回収した。ついで、直径 1cm のカラムに 25g のシリカゲルを充填したカラムを用い、展開溶剤としてクロロホルムを使用して、上記の反応混合物約 230mg を分離し、未反応の脂肪酸メチルエステル 135mg を回収した。

このようにして得た未反応の脂肪酸メチルエステルの脂肪酸組成を第 1 表に示した。この表より、実施例 1 の場合と同様の良好な濃縮結果が得られていることが判る。

#### 実施例 3

脂肪酸混合物の低級 1 価アルコールエステルとして、実施例 1 で使用した、いわし油由来の脂肪酸メチルエステルを使用した。

まず、50ml のスクリー管に 2g の上記い

16

わし油由来の脂肪酸メチルエステルと 2ml のテフロン製攪拌子を入れ、これを酵素反応装置 (松本製作所製、MS-50 型) に入れて回転攪拌しながら 37℃ で約 30 分間保温した。つぎに、キャンディダ・シリンドラツセ (*Candida cylindracea*) 由来のリパーゼ (名糖産業株製、商品名リパーゼ OF) が、200IU/g となるように調整した 90 重量%グリセリン水溶液を 10g 加えて 20 時間エステル交換反応を行った。

反応終了後、リパーゼを失活させるため沸騰水中で約 20 分間加熱したのち、n-ヘキサンで反応混合物を抽出することにより 1.8g の反応混合物を回収した。ついで、直径 1cm のカラムに 25g のシリカゲルを充填したカラムを用い、展開溶剤としてクロロホルムを使用して、上記の反応混合物約 160mg を分離し、未反応の脂肪酸メチルエステル 104mg を回収した。

このようにして得た未反応の脂肪酸メチルエステルの脂肪酸組成を第 1 表に示した。この表より、実施例 1、2 の場合と同様の良好な濃縮結果が得

17

18

られていることが判る。

#### 実施例 4

脂肪酸混合物の低級1価アルコールエステルとして、いわし油（山陰産菜油型）を、触媒としてソディウムエチラートを使用する常法によりエチルエステル化したのち、蒸留した脂肪酸エチルエステルを使用した。この脂肪酸エチルエステルの脂肪酸組成を第1表に示した。

まず、2 l の四ツ口フラスコに20.0 g の上記いわし油由来の脂肪酸エチルエステルを入れ、窒素ガス気流下、湯浴中で攪拌しながら35℃で約30分間保温した。つぎに、キャンディダ・シリンドラツセ(*Candida cylindracea*)由来のリパーゼ（名産産業研製、商品リパーゼOF）を400 IU/g となるように調整した90重量%グリセリン水溶液を1.000 g 加えて20時間エステル交換反応を行った。

反応終了後、リパーゼを失活させるため湯浴温度を約85℃に上昇させ約20分間加熱したのち、温水500 ml を加え、分液ロートに移して分層

させ、反応混合物190 g を回収した。ついで、この反応混合物を減圧蒸留して、未反応の脂肪酸エチルエステルを分離した。

このようにして得た未反応の脂肪酸エチルエステルの脂肪酸組成を第1表に示した。この表より、実施例1～3の場合と同様の良好な濃縮結果が得られていることが判る。

#### 実施例 5

脂肪酸混合物の低級1価アルコールエステルとして、ルリジシヤ油を、触媒としてソディウムメチラートを使用する常法によりメチルエステル化したのち、蒸留した脂肪酸メチルエステルを使用した。この脂肪酸メチルエステルの脂肪酸組成を第1表に示した。

まず、50 ml のスクリー管に2 g の上記ルリジシヤ油由来の脂肪酸メチルエステルと2 cc のテフロン製攪拌子を入れ、これを酵素反応装置（松本製作所製、MS-50型）に入れて回転攪拌しながら37℃で約8.0分間保温した。つぎに、キャンディダ・シリンドラツセ(*Candida cylindr*

19

*acea*) 由来のリパーゼ（名産産業研製、商品名リパーゼOF）が、200 IU/g となるように調整した90重量%グリセリン水溶液を10 g 加えて2時間エステル交換反応を行った。

反応終了後、リパーゼを失活させるため沸騰水中で約20分間加熱したのち、n-ヘキサンで反応混合物を抽出することにより1.9 g の反応混合物を回収した。ついで、直径1 cm のカラムに25 g のシリカゲルを充填したカラムを用い、展開溶剤としてクロロホルムを使用して、上記の反応混合物約200 mg を分離し、未反応の脂肪酸メチルエステル115 mg を回収した。

このようにして得た未反応の脂肪酸メチルエステルの脂肪酸組成を第1表に示した。この表よりΔ5の位置に二重結合を有するγ-リノレン酸が、有効に濃縮されていることが判る。

20

| 脂肪酸組成            | 第1表  |      |      |      |      |      |      |      |      |       |
|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
|                  | 16:0 | 16:1 | 18:1 | 18:2 | 18:3 | 20:3 | 22:5 | 22:6 | その他  | 合計    |
| いわし油<br>脂肪酸メチル   | 17.0 | 7.1  | 12.4 | 9.8  | 13.1 | 13.1 | 1.9  | 10.9 | 97.6 | 190.8 |
| 実施例1             | 13.5 | 5.1  | 8.7  | 15.2 | 15.2 | 15.2 | 2.8  | 15.3 | 98.3 | 190.8 |
| 実施例2             | 13.3 | 5.5  | 8.7  | 15.8 | 15.8 | 15.8 | 2.9  | 17.0 | 98.8 | 190.8 |
| 実施例3             | 12.4 | 5.6  | 8.2  | 16.1 | 16.1 | 16.1 | 3.2  | 18.2 | 98.3 | 190.8 |
| いわし油<br>脂肪酸エチル   | 17.3 | 7.2  | 12.8 | 12.8 | 12.8 | 12.8 | 1.8  | 11.2 | 97.4 | 190.8 |
| 実施例4             | 12.9 | 5.0  | 9.6  | 15.9 | 15.9 | 15.9 | 2.8  | 17.9 | 95.9 | 190.8 |
| ルリジシヤ油<br>脂肪酸メチル | 12.1 | 0.4  | 20.1 | 18.8 | 18.8 | 18.8 | -    | -    | 48.6 | 190.8 |
| 実施例5             | 10.3 | 0.3  | 17.0 | 27.7 | 27.7 | 27.7 | -    | -    | 44.7 | 190.8 |

21

-698-

22

以上の結果から、本発明の方法を用いることにより、Δ 4、Δ 5、Δ 6のいずれかの位置に二重結合を有する不飽和脂肪酸エステルを効率的に選別できるものであることが明らかである。

特許出願人 日本油脂株式会社

代理人 弁護士 柳 宜元 邦夫

